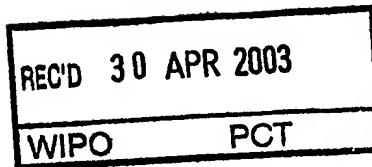




REPÚBLICA DE CUBA



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número setenta y seis del año dos mil dos del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGENICA**, con fecha quince de abril de dos mil dos, a las nueve horas y treinta minutos ante meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**, cuya invención fue creada por Mónica Bequet Romero; Boris Ernesto Acevedo Castro; Jorge Víctor Gavilondo Cowley; Luis Enrique Fernández Molina; Omar López Ocejo; Ricardo de la Caridad Silva Rodríguez; Alexis Musachio Lasa; Ernesto Galbán Rodríguez y Dania Marcia Vázquez Blomquist.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación:

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva y las Reivindicaciones son iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Argia Poveda Marcheco, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los treinta y un días del mes de marzo de dos mil tres.

Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

RESUMEN**INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGÉNICA.**

- 5 Aplicacion de secuencias oligonucleotídicas y polipeptídicas de moléculas pertenecientes a la familia del factor de permeabilidad vascular (VPF), sus receptores y correceptores; así como modificaciones de los mismos, en la inmunoterapia activa de entidades patológicas cuyo curso se asocia al aumento de la vasculatura.
- 10 Estos procedimientos pueden ser empleados en la terapia única o combinada para el tratamiento del cáncer y sus metástasis, los procesos inflamatorios agudos y crónicos, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, hemangiomas y los angiofibromas, entre
- 15 otros.

20

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial CIBIO

25

30

35

40

45

MEMORIA DESCRIPTIVA
INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGÉNICA

La presente invención esta relacionada con el campo de la biotecnología y la industria farmacéutica, en particular con la inmunización activa empleando como blanco moléculas relacionadas con la angiogénesis.

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos pre-existentes se denomina angiogénesis. Este evento se encuentra ampliamente regulado por un equilibrio de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Entre las enfermedades cuyo curso se ha relacionado con la inducción de factores pro-angiogénicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos de forma anómala están:

(a) el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis), (b) procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la ateroesclerosis, y los edemas tisulares, (c) enfermedades de origen infeccioso como las Hepatitis y el sarcoma de Kaposi, (d) enfermedades autoinmunes como la diabetes, la soriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis, y (e) otras varias enfermedades y estados tales como la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, los hemangiomas y los angiofibromas (Carmellet P y Jain RK. Nature 407:249, 2000; Kuwano M, et al. Intern Med 40:565, 2001). Un procedimiento terapéutico potencialmente atractivo para muchos de estos casos pudiera basarse en la inhibición de la actividad de los factores proangiogénicos que estimulan la formación anómala de vasos, mediante su neutralización o la de sus receptores, o la eliminación de la fuente productora de los mismos.

Los factores de crecimiento del endotelio vascular son una familia de moléculas que inducen de manera directa y específica la formación de nuevos vasos (Leung Science 246:1306, 1989; Klagsburn M, Annual Rev Physiol 33:217, 1991). Esta familia comprende al factor de permeabilidad vascular, también conocido como factor de crecimiento del endotelio vascular VPF/VEGF (ahora denominado VEGF-A), el factor de crecimiento de placenta PIGF, los factores de crecimiento derivados de plaquetas PDGF-A y PDGF-B, y otras cuatro nuevas moléculas relacionadas estructural y funcionalmente con el VEGF-A, que se han denominado VEGF-B/VRF, VEGF-C/VRP, VEGD-D/FIGF, y VEGF-E (Olofsson B et al. PNAS USA 13:2576, 1996; Joukov V et al. EMBO J 15:290, 1996; Yamada Y et al. Genomics 42:483, 1997; Ogawa S et al. J Biol Chem 273:31273, 1998).

El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 23 kDa (Ferrara N, et al. Biochem Biophys Res Comun 165:198, 1989) de la cual

existen 5 isoformas monoméricas derivadas del corte y empalme diferencial de un mismo ARN. Estas incluyen 2 isoformas que se mantienen unidas a la membrana celular (VEGF 189 y VEGF 206) y 3 de naturaleza soluble (VEGF 121, VEGF 145, y VEGF 165). La isoforma VEGF 165 es la más abundante en tejidos de mamíferos, excepto en pulmón y corazón, donde predomina el VEGF 189 (Neufeld G et al. Canc Met Rev 15:153, 1995), y en placenta, donde prevalece la expresión del VEGF 121. (Shibuya MA et al. Adv Canc Res 67:281, 1995).

El VEGF-A es la proteína más estudiada y caracterizada de esta familia, por lo que su alteración se ha descrito en un número mayor de enfermedades. Su sobre-expresión se asocia con tumores de diferente origen y localización y sus metástasis (Grunstein J et al. Cancer Res 59:1592, 1999), procesos inflamatorios crónicos como la colitis ulcerativa y enfermedad de Chron (Kanazawa S, et al. Am J Gastroenterol 96:822, 2001), psoriasis (Detmar M, et al. J Exp Med 180:1141, 1994), distrés respiratorio (Thickett DR et al. Am J Respir Crit Care Med 164:1601, 2001), ateroesclerosis (Celletti FL et al. Nat Med 7:425, 2001; Couffinhal T et al. Am J Pathol 150:1653, 1997), endometriosis (McLaren J. Hum Reprod Update 6:45, 200), asma (Hoshino M, et al. J Allergy Clin Immunol 107:295, 2001), artritis reumatoide y osteoarthritis (Pufe T et al. J Rheumatol 28:1482, 2001), tiroiditis (Nagura S et al. Hum Pathol 32:10, 2001), retinopatía diabética y del recién nacido (Murata T et al. Lab Invest 74:819, 1996; Reynolds JD. Paediatr Drugs 3:263, 2001), degeneración macular y glaucomas (Wells JA et al. Br J Ophthalmol 80:363, 1996; Tripathi RC et al. Ophthalmology 105:232, 1998), edemas tisulares (Kaner RJ et al Am J Respir Cell Mol Biol. 22:640 2000; Ferrara N Endocrinol Rev 13:18, 1992), obesidad (Tonello C et al. FEBS Lett 442:167, 1999), hemangiomas (Wizigmann S y Plate KH Histol Histopathol 11:1049, 1996), en el líquido sinovial de pacientes con artropatías inflamatorias (Bottomley MJ et al Clin Exp Immunol 119:182, 2000) y asociado al rechazo al transplante (Vasir B, et al. Transplantation 71:924, 2001). En el caso particular de los tumores, las células que expresan las tres isoformas básicas del VEGF-A: 121, 165 y 189, son las que crecen con mayor rapidez *in vivo*; mientras que en sus estadios finales los tumores limitan la expresión a la isoforma 165 o, en ausencia de esta, a una combinación de 121 con 189, que lejos de ser aditiva, evidencia una cooperación que fortalece la red vascular tumoral (Grunstein J. Mol Cell Biol 20:7282, 2000).

En 1991 se describió el PIGF, que no es capaz de inducir la proliferación endotelial en su forma homodimérica (Maglione D et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:9267, 1991, DiSalvo J et al. J Biol Chem 270:7717, 1995). Con la sobre-regulación del PIGF y con ello de la señal que se transmite vía VEGFR1, las células endoteliales

amplifican su respuesta al VEGF durante el cambio al fenotipo angiogénico que se asocia a ciertas patologías (Carmeliet P et al. Nat Med 7:575, 2001) la expresión del PIGF se ha relacionado con la vascularización en meningiomas y gliomas humanos (Nomura M et al. J Neurooncol 40:123,1998). Esta molécula forma heterodímeros

5 con el VEGF165 con actividad proangiogénica, cuya sobre-expresión se ha descrito en el medio condicionado por diversas líneas celulares de origen tumoral (Cao Y et al. J Biol Chem 271:3154,1996), y asociado a la evolución de la artritis reumatoide y las artropatías inflamatorias primarias en general (Bottomley MJ et al. Clin Exp Immunol 119:182, 2000)

10 La sobre-expresión del resto de los miembros de la familia del VEGF, menos estudiados, se asocia también a diversas patologías. El VEGF-B se ha relacionado con los tumores de mama, ovario, riñón, melanoma, y los fibrosarcomas (Sowter HM, et al. Lab. Invest. 77:607,1997; Salven P Am. J. Pathol. 153:103, 1998, Cunningham SP et al. Cancer Res 61:3206, 2001), y la expresión diferenciada *in vitro*

15 de la isoforma VEGF-B 167 se ha reportado en células tumorales de diferentes orígenes (Li X, et al. Growth Factors 19:49, 2001). Los VEGF-C y VEGF-D se implican en la regulación de la formación de vasos linfáticos (Joukov V et al. EMBO J 15:290) y la sobre-expresión del VEGF-C se ha asociado a edemas tisulares, tumores de mama, pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, linfomas, próstata,

20 y nódulos metastásicos (Kajita T, et al. Br J Cancer 85:255, 2001; Kitadi Y, et al Int J Cancer 93:662, 2001; Hashimoto I, et al. Br J Cancer 85:93, 2001; Kinoshita J, et al. Breast Cancer Res Treat 66:159, 2001; Ueda M, et al. Gynecol Oncol 82:162, 2001; Salven P Am. J. Pathol. 153:103, 1998; O-Charoenrat P et al. Cancer 92:556, 2001).

25 En el caso del VEGF-D, su sobre-expresión por células tumorales se ha relacionado a un aumento *in vivo* de la vasculatura linfática tumoral y al incremento de las metástasis en nódulos linfáticos (Stacker SA, et al. Nat Med 7:186, 2001; Marconcin L et al. Proc Natl Acad Sci U S A 96:9671, 1999).

Las alteraciones de la función de las células endoteliales inducidas por las moléculas de la familia del VEGF están mediadas por la unión de estas a receptores celulares

30 tirosina quinasa clase III, que hasta ahora incluyen al VEGFR1 (Flt1), al VEGFR2 (KDR/Flk1) y al VEGFR3 (Flt4) (Kaipainen A J. Exp. Med. 178:2077, 1993). Se ha identificado el dominio 2 N-terminal como el responsable de la unión a los ligandos, propiciándose la fosforilación del dominio citoplasmático y la transducción de la señal (Davis-Smyth T et al EMBO 15:4919, 1996).

35 Los ligandos identificados para el VEGFR1 incluyen el VEGF-A, el PIGF, y el VEGF-B, en orden decreciente de afinidad (Shibuya M Int J BiochemCell Biol 33: 409, 2001). En células endoteliales este receptor "secuestra" el VEGF circulante (Gille H

et al *EMBO J.* 19:4064, 2000). La unión del VEGF-A al VEGFR1 expresado en el linaje hematopoyético influye de manera significativa sobre la activación del factor transcripcional NF_kB en los precursores de células dendríticas, y en linfocitos B y T. Esta última interacción es relevante en el establecimiento *in vivo* de un balance inmunológico desfavorable donde disminuye la maduración de células dendríticas y la fracción de linfocitos T, fenómeno observado en pacientes inmunosuprimidos, y en particular con cáncer (Dikov MM et al *Canc Res* 61:2015, 2001; Gabrilovich D et al. *Blood* 92:4150, 1998). La sobre-expresión de este receptor se ha relacionado con la soriasis, el cáncer de endometrio, y el carcinoma hepatocelular (Detmar M, et al. *J Exp Med* 180:1141, 1994; Yokoyama Y et al *Gynecol Oncol* 77:413, 2000; Ng IO Am *J Clin Patol* 116:838, 2001).

El receptor VEGFR2 (KDR/Flik1) media los efectos biológicos del VEGF-A, y también se une a los ligandos VEGF-C y VEGF-D. Este receptor se expresa de manera diferencial en el endotelio activo y en algunas líneas celulares de origen tumoral donde establece lazos autocrinos con el VEGF secretado. Además de estar involucrado en las patologías ya descritas que se relacionan con la sobre-expresión de sus ligandos, su sobre-expresión en particular se ha relacionado con el avance: del cáncer de endometrio (Giatromanolaki A et al, *Cancer* 92:2569, 2001), de mesoteliomas malignos (Strizzi L et al. *J Pathol* 193:468, 2001), de neoplasmas astrocíticos (Carroll RS et al. *Cancer* 86:1335, 1999), de cáncer primario de mama (Kranz A et al. *Int J Cancer* 84:293, 1999), de cáncer gástrico tipo intestinal (Takahashi Y et al *Clin Cancer Res* 2:1679, 1996), de glioblastoma multiforme, oligodendrogliomas anaplasticos, y ependimomas con necrosis (Chan AS et al. *Am J Surg Pathol* 22:816, 1998). La sobre-expresión del KDR se ha asociado, además, a la enfermedad autonómica VHL y a hemangioblastomas (Wizigmann-Voos S et al *Cancer Res* 55:1358, 1995), al avance de la retinopatía diabética (Ishibashi T. *Jpn J Ophthalmol* 44:323. 2000) y, junto al Flt-1, a las reacciones de hipersensibilidad retardada (Brown LF et al *J Immunol* 154:2801, 1995).

La linfangiogénesis mediada por VEGFC y VEGFD tiene lugar a partir de la unión de estos a su receptor FLT4 o VEGFR3 que se expresa en el endotelio linfático. En algunos casos aún cuando no hay sobre-expresión de los ligandos el aumento de la expresión del receptor se ha relacionado con un pronóstico adverso en el desarrollo de un grupo de entidades patológicas, a resaltar: la retinopatía diabética (Smith G. *Br J Ophthalmol* 1999 Apr;83(4):486-94), la inflamación crónica y las úlceras (Paavonen K et al, *Am J Pathol* 156:1499, 2000), el establecimiento de metástasis en nódulos linfáticos y evolución del cáncer de mama (Gunningham SP. *Clin Cancer Res* 6:4278, 2000 Valtola R et al. *Am J Pathol* 154:1381, 1999), asociado a tumores

nasofaríngeos y a carcinomas escamosos orales (Saaristo A et al. Am J Pathol 157:7, 2000; Moriyama M et al. Oral Oncol 33:369, 1997). Además, la sobre-expresión del VEGFR3 es un marcador sensible del sarcoma de Kaposi, los hemangioendoteliomas tipo Dabska y de la linfangiomatosis cutánea (Folpe AL et al. Mod Pathol 13:180, 2000; Lymboussaki A et al. Am J Pathol 153:395, 1998).

5 Recientemente se identificaron dos receptores con capacidad de unión a VEGF denominados NRP1 y NRP2 que pertenecen a la familia de las neuropilinas (NRP), y que actúan como co-receptores para isoformas específicas de varias proteínas de la familia del VEGF: VEGF-A₁₄₅ VEGF-A₁₆₅, VEGF-B₁₆₇ y PIGF1, aumentando su

10 capacidad mitogénica. La expresión de NRP1 se ha convertido en un marcador de agresividad en cáncer de próstata, se ha relacionado con el aumento de la angiogénesis en melanomas, y con eventos de escape a la apoptosis en metástasis de cáncer de mama (Latil A et al. Int J Cancer 89:167, 2000; Lacal PM J Invest Dermatol 115:1000, 2000; Bachelder RE Cancer Res 61:5736, 2001). La sobre-

15 expresión coordinada de NRP1, KDR y VEGF-A₁₆₅ se ha relacionado además con la proliferación fibrovascular en los casos de retinopatía diabética y artritis reumatoide (Ishida S. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 1649, 2000; Ikeda M. Et al. J Pathol 191:426, 2000). El NRP2 se sobre-expresa en osteosarcomas, donde promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Handa A et al. Int J Oncol 17:291, 2000).

20 La mayor parte de las estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la angiogénesis, especialmente para cáncer, se basan en el bloqueo de las moléculas de la familia del VEGF y sus receptores, resaltando los ensayos clínicos en curso donde se emplean: (1) anticuerpos monoclonales bloqueadores del VEGF o del receptor KDR, (2) inhibidores de las metaloproteinasas, como el Neovastat y el

25 Prinomastat, (3) inhibidores del VEGF como la Talidomida, el Suramin, la Troponina I, el IFN- α y el Neovastat, (4) bloqueadores de receptores del VEGF como los SU5416, FTK787 y SU6668), (5) inductores de apoptosis del endotelio tumoral como la Endostatina y el CA4-P, y (6) ribozimas que disminuyen la expresión del VEGF o de sus receptores (Angiozyme). Debido a la alta homología entre el VEGF humano y

30 sus receptores Flt-1 y KDR con sus homólogos murinos (~90%, 81% y 89%, respectivamente), muchos modelos animales se emplean rutinariamente para evaluar la efectividad preclínica de los compuestos anti-angiogénicos dirigidos contra este sistema (Hicklin DJ et al. DDT 6:517, 2001).

La administración pasiva de anticuerpos anti-VEGF o anti-VEGFR se ensaya con

35 éxito en diferentes fases clínicas en humanos (Hicklin DJ et al. DDT 6:517, 2001). Un AcM humanizado anti-VEGF (A.4.6.1, Genentech, San Francisco, Estados Unidos) se encuentra en ensayo clínico fase III para el tratamiento de tumores de

colon, mama, riñón, y pulmón (Kim, KJ et al. *Nature* 362:841, 1993; Boersig C. R&D Directions Oct 7:44, 2001). En particular, para el caso del receptor KDR se ha desarrollado un AcM (IMC-1C11, ImClone) que reconoce el dominio extracelular N-terminal de dicho receptor, e inhibe la proliferación y migración de células leucémicas humanas, alargando la vida de los ratones xenotransplantados. En la actualidad se estudia su efecto en pacientes con metástasis de cáncer de colon (Dias S et al. *J Clin Invest* 106:511, 2000). En los ensayos antes mencionados se ha demostrado la ausencia de efectos adversos concomitantes con la aplicación pasiva de estos AcMs (Hicklin DJ et al. *DDT* 6:517, 2001).

10 No obstante a lo anterior, una modalidad terapéutica no empleada aún para el bloqueo de la neo-angiogénesis es la immunoterapia activa específica (IAE). En la IAE del cáncer se emplean como antígenos péptidos, proteínas o ADN, mezclados con adyuvantes apropiados. Los procedimientos de IAE persiguen estimular una respuesta inmune tanto de tipo humoral (activación de linfocitos B) como celular (activación de linfocitos T citotóxicos y auxiliadores, y de células asesinas naturales), asociada a la función de las células dendríticas, como presentadoras profesionales de antígenos en los contextos del tipo MHC I y II (Bystryn JC, *Medscape Hematology-Oncology* 4:1, 2001; Parker, KC et al., *J. Immunol* 152:163, 1994; Nestle FO et al., *Nature Medicine* 7:761, 2001; Timmerman JM, *Annual Review Medicine* 50:507, 1999).

15 La IAE es un campo de investigación experimental y clínica en expansión acelerada, con aplicaciones muy atractivas, especialmente en la oncología donde se reportan más de 60 ensayos clínicos en curso basados en procedimientos de IAE, lo que supera en la actualidad los ensayos clínicos basados en anticuerpos monoclonales.

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 107

contenido de VEGF y de sus receptores en la vasculatura asociada al tumor (Brekken RA. J Control Release 74:173, 2001). Las células pertenecientes al estroma también secretan VEGF en respuesta al estímulo de las células transformadas, de ahí que aún cuando se eliminan las células tumorales los niveles 5 de VEGF persistan en los pacientes. La presencia de VEGF y de sus receptores posee ya un valor práctico para el establecimiento de pronósticos y estadiamiento en casos de tumores de próstata, cérvix y mama (George DJ et al. Clin Cancer Res 7:1932, 2001; Dobbs SP et al. Br J Cancer 76:1410, 1997; Callagy G et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 8:104, 2000). Por otra parte, el VEGF se encuentra 10 también entre los factores solubles que, junto a otras citocinas como la IL-10, el TNF- α y el TGF- β , (Ohm JE y Carbone DP, Immunol Res 23:263, 2001), pueden estar implicados en la inmunosupresión que se observa en los pacientes de cáncer (Staveley K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 95:1178, 1998; Lee KH, et al. J Immunol 161:4183, 1998). Este efecto "inmunosupresor" parece depender de su unión al 15 receptor Flt1 (Gabrilovich D et al. Blood 92:4150, 1998).

La presente invención describe procedimientos de IAE en tumores experimentales empleando moléculas de la familia del VEGF y sus receptores. Los efectos anti-tumorales obtenidos pueden basarse en al menos cuatro mecanismos diferentes, sin descartar sus posibles combinaciones: (a) la destrucción directa de las células 20 cancerosas y estromáticas que producen el VEGF por linfocitos citotóxicos, (b) la afectación de las células endoteliales de los vasos asociados al tumor debido al secuestro o neutralización del VEGF circulante mediante anticuerpos, (c) la destrucción directa de las células endoteliales que expresan receptores para el VEGF, mediante linfocitos citotóxicos o anticuerpos fijadores de complemento, (d) la 25 activación de la respuesta inmune local mediante el secuestro o neutralización del VEGF circulante y la consiguiente eliminación de sus efectos inmunosupresores.

Idealmente, estos tratamientos pudieran servir para disminuir o evitar la aparición de metástasis, reducir o eliminar el tumor primario como terapia de primera o segunda línea, en asociación o no con otros agentes anti-tumorales.

30 La inmunización activa dirigida a la familia del VEGF y sus receptores también sería eficaz en la terapéutica única o combinada para el tratamiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos (asma, distrés respiratorio, endometriosis, ateroesclerosis, edemas tisulares), enfermedades infecciosas (Hepatitis, sarcoma de Kaposi), enfermedades autoinmunes (diabetes, soriasis, artritis reumatoide, tiroiditis, 35 sinovitis), la retinopatía diabética y del recién nacido, rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, hemangiomas y los angiofibromas, entre otros.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la presente invención, la administración "in vivo" de secuencias oligonucleotídicas que codifican para proteínas de la familia del VEGF, sus receptores, co-receptores o fragmentos de las mismas, así como de sus variantes polipeptídicas; induce una respuesta inmune humoral y celular con un efecto antiangiogénico y antitumoral.

Los inmunógenos de naturaleza polipeptídica de interés para la presente invención, así como sus fragmentos, pueden ser aislados de sus fuentes naturales u obtenidos por vía sintética o recombinante. Estos polipéptidos también pueden producirse fusionados a proteínas con actividad adyuvante reconocida como la p64K (R. Silva et al US 5286484 y EP 0474313) o unirse a las mismas de forma covalente luego de su obtención individual. Otra estrategia disponible en estos casos es la obtención del polipéptido natural, sus variantes mutadas o modificadas, y sus fragmentos, como parte de lazos expuestos o no en proteínas bacterianas como la OMP1 que forman parte de preparaciones con actividad inmunoestimuladora, en este caso particular VSSP (R. Perez et al US 5788985 y 6149921). Es posible, además, obtener el inmunógeno polipeptídico expuesto en la superficie de una partícula viral (HbsAg, VP2 de parvovirus, etc.), unido a péptidos de unión a células u órganos especializados en la inducción de respuesta inmune (CTLA4, segmento Fc de Ig, etc.), o a proteínas capaces de aumentar la biodistribución, tales como VP22.

Las fuentes naturales principales de las proteínas de interés para esta invención se expresan predominantemente en la placenta, en células endoteliales activadas, y en células tumorales. El ARNm de estas células o tejidos se utiliza para obtener ADN complementario (ADNc) por métodos conocidos. El ADNc extraído se usa como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de los ADNc correspondientes al antígeno seleccionado. En cada caso se usan cebadores que se diseñan según las características del vector donde el ADNc va a ser insertado y de las secuencias previamente reportadas de las proteínas de interés.

De forma alternativa y sobre todo en el caso de los receptores amplificados por RCP, que son los antígenos de mayor talla que se utilizan en la presente invención, la región codificante es amplificada en dos o más fragmentos sobrelapados. Estos fragmentos incluyen un sitio de empalme común que permite el ensamblaje del ADN intacto a partir de sus fragmentos.

Una alternativa para el clonaje de los antígenos de interés es la selección a partir de librerías de ADN comerciales derivadas de endotelio humano o de tumores de este mismo origen. En algunos casos pudiera desearse mutar alguno de los antígenos

objeto de la presente invención de manera que, sobre todo en el caso de la familia del VEGF no ocurra un evento de inducción de la angiogénesis producto de la vacunación. Estas mutaciones se realizan dirigidas preferentemente hacia los sitios de unión con los receptores ya descritos en la literatura. Para ello se diseñan cebadores apropiados que cubren ambos extremos de la molécula deseada y cuyos productos se emplean como molde para obtener la molécula mutada. Estas variantes mutadas carecen de actividad biológica pero reproducen las propiedades inmunogénicas del antígeno seleccionado.

Las moléculas de ADNc obtenidas por los métodos descritos anteriormente son administradas mediante un vector que las porte, pudiendo ser este un virus, un plasmidio, un cromosoma artificial de bacteria, o similares. El vector porta los elementos necesarios para la expresión adecuada de dicho gen en la célula blanco, así como el resto de los elementos que le permiten ser obtenido en el sistema celular hospedero acorde con su naturaleza. Las moléculas de ADN de la presente invención pueden contener uno o más genes de interés, constituidos por uno más ácidos nucleicos (ADNc, ADNg, ADN sintético o semisintético, o similares), cuya transcripción y traducción (cuando sea apropiada) en la célula blanco genere los productos de valor terapéutico/vacunal.

Generalmente, el gen del producto terapéutico/vacunal de acuerdo a la invención, se encuentra bajo el control de un promotor transcripcional que es funcional en la célula blanco o el organismo (mamíferos), así como una región 3' terminal, que contiene las señales necesarias para la terminación y poliadenilación del ARNm del producto de interés, permitiendo su expresión. El promotor puede ser el promotor natural del gen empleado, o un promotor heterólogo, transcripcionalmente activo en la célula blanco. El promotor puede ser de genes eucariontes, o de origen viral. Entre los promotores eucariontes, es posible emplear cualquier promotor o secuencia derivada que estimule o reprime la transcripción del gen, específicamente o no, induciblemente o no, fuerte o débilmente. Adicionalmente, la región promotora puede ser modificada por inserción de secuencias activadoras o inductoras, permitiendo la expresión tejido-específica o predominante del gen en cuestión.

Además, el gen de interés puede contener una secuencia señal de localización subcelular, de manera que pueda modificarse su localización y/o secreción al medio extracelular, en la célula donde el mismo se expresa, o fuera de ella una vez sintetizado. También puede contener una región de unión específica a un ligando específico de tejido inmune, siendo dirigido hacia el sitio donde se genera la respuesta, obteniéndose el efecto terapéutico / vacunal.

Adicionalmente, el gen de interés puede estar precedido de la secuencia codificante para una maquinaria replicativa del ARNm, de manera que permita la amplificación del ARNm en la célula blanco, incrementando la expresión de dicho gen, y con ello el efecto terapéutico/vacunal de acuerdo a la invención. La maquinaria replicativa en cuestión puede ser de origen alfaviral (Schlesinger, 2001), más específicamente, derivada del virus Sindbis o Semliki, o similares. En este caso particular, el gen de interés se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor subgenómico, que permite la amplificación de su ARNm dentro de la célula blanco, una vez que las moléculas de acuerdo a la presente invención han sido internalizadas. El vector de ADN puede contener, además, secuencias que permitan la replicación en células de mamíferos de las moléculas de la presente invención. Ello permite incrementar los niveles de expresión y/o el efecto terapéutico / vacunal (Collings, 1999; Menaa et al, 2001).

El vector de ADN puede ser purificado mediante las técnicas estándar para la purificación de ADN plasmídico. Estas técnicas comprenden el método de purificación en gradiente de densidad por cloruro de cesio, en presencia de bromuro de etidio, o alternativamente, el uso de columnas de intercambio iónico (Maniatis et al, 1989) o cualquier otro intercambiador o método para la separación de moléculas de ADN (Ferreira et al, 2000).

La presente invención comprende el uso de vectores de ADN plasmídico, preferentemente los pertenecientes a la familia pAEC, de vectores compactos para inmunización con ADN y terapia génica en humanos (Herrera et al, Biochem. Biophys. Res. Commu. 279: 548, 2000). Estos comprenden específicamente los vectores pAEC-K6 (Número de acceso AJ278712), pAEC-M7 (Número de acceso AJ278713), pAEC-Δ2 (Número de acceso 278714), pAEC-SPE (Número de acceso AJ278715) y pAEC-SPT (Número de acceso AJ278716). Estos vectores contienen sólo los elementos imprescindibles para la expresión del producto de interés en células de mamíferos, incluidas células humanas, y una unidad de replicación en *Escherichia coli*. La unidad transcripcional está compuesta por el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, un sitio múltiple de clonaje versátil para la inserción del producto de interés, y la secuencia de terminación transcripcional y poliadenilación derivada del virus de simio 40 (SV40). En la unidad replicativa, el vector contiene el gen de resistencia a kanamicina (*Tn*903) y un origen de replicación pUC19 (ColE1), para garantizar un alto número de copias y la selección de la bacteria que porta el plasmidio de interés.

Además, la presente invención comprende el uso de vectores de ADN plasmídico, preferentemente los pertenecientes a la familia pMAE, de vectores compactos para

inmunización con ADN en humanos. Estos contienen los mismos elementos funcionales en bacteria, que los vectores de la serie pAEC, así como el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano y el sitio múltiple de clonaje. Además, portan un intrón sintético, y una secuencia sintética de terminación de la transcripción y poliadenilación, derivada de la globina β de conejo. Se ha reportado que secuencias similares a esta últimas permiten obtener mayores niveles de expresión del gen clonado (Norman JA et al, Vaccine 15: 801,1997). Adicionalmente, los vectores de esta serie portan repeticiones consecutivas de secuencias inmunoestimuladoras (motivos CpG), que estimulan al sistema inmune innato de ratones y humanos, con la consiguiente activación de respuesta humoral y celular contra la molécula de interés (Krieg AM, Vaccine 19:618, 2001).

La inmunización con virus recombinantes (adenovirus, adeno-asociados, vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela de canario, entre otros) produce una respuesta celular citotóxica potente en los hospederos. Para introducir la secuencia de interés en los virus recombinantes se utilizan vectores que poseen secuencias de integración y promotores particulares para cada especie viral. Esta estrategia también se incluye dentro del alcance de la presente invención, y se utiliza preferentemente el virus de la viruela aviar y el vector pFP67xgpt. Este vector se emplea para el clonaje de genes bajo un promotor fuerte temprano / tardío de naturaleza sintética entre los marcos de lectura abierto 6 y 7 de un fragmento de 11.2kB BamHI del virus de viruela aviar FP9. Este plasmidio además contiene el gen Ecogpt controlado por el promotor de vaccinia p7.5K que se utiliza para identificar los virus recombinantes.

Otra alternativa de la presente invención consiste en la inmunización con proteínas de la familia del VEGF, sus receptores y/o correceptores. Las moléculas de ADNc obtenidas por los métodos descritos anteriormente son clonadas en vectores de expresión en virus bacterias, levaduras, fagos, plantas o células superiores, para obtener las variantes proteicas de los antígenos, después de haberse verificado su secuencia empleando los métodos tradicionales de secuenciación automática.

Varios vectores de expresión han sido descritos y empleados para la obtención de proteínas recombinantes. Estos vectores contienen al menos una secuencia controladora de la expresión que está unida operativamente a la secuencia del ADN o fragmento que se desee expresar. Ejemplos de secuencias útiles en el control de la expresión son: los sistemas lac, trp, tac, y trc, las regiones promotoras y el operador principal del fago lambda, la región controladora de la proteína de superficie fd, los promotores glicolíticos de levadura (por ejemplo el de la 3 fosfoglicerato quinasa), los promotores de la fosfatasa de levadura ácida (por

ejemplo Pho5), los promotores de levadura del factor de unión alfa y los promotores derivados de poliomitas, adenovirus, retrovirus, virus simios (por ejemplo los promotores tempranos y tardíos o SV40) y otras secuencias conocidas que regulan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas, sus virus y sus combinaciones.

Los hospederos que se emplean para la replicación de estos vectores y la obtención de proteínas recombinantes objeto de esta invención incluyen células procariotas y eucariotas. Entre los procariotas se incluyen: *E. Coli* (DH1, MRCI, HB101, W3110, SG-936, X1776, X2282, DH5a), *Pseudomonas*, *Bacillus Subtilis*, *Streptomices*, y otros. En el caso de las células eucariotas, se incluyen levaduras u otros hongos, insectos, células animales como por ejemplo COS y CHO, células humanas y de plantas y cultivos de tejidos, entre otros. Seguidamente a la expresión en el sistema escogido en un medio adecuado, los polipéptidos o péptidos pueden ser aislados por métodos conocidos.

15

Uso de adyuvantes

Aún cuando la vacunación con ADN desnudo o proteínas ha demostrado ser efectiva en ciertos modelos animales, los pacientes afectados por tumores o enfermedades autoinmunes, representan un reto para la estrategia terapéutica que propone la presente invención. Con el objetivo de favorecer el desarrollo de la respuesta inmune las vacunas de ADN o proteína pueden ser combinadas con inmunopotenciadores ya descritos como por ejemplo: Sales minerales (Ej., Hidróxido de aluminio, Fosfato de aluminio, Fosfato de calcio); inmunoestimuladores como: citocinas (Ej., IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-18), moleculares (CD40, CD154, cadena invariante de MHC tipo I, LFA3); saponinas (Ej., QS21), derivados de MDP, oligonucleótidos CpG, LPS, MPL y polifosfatos; partículas lipídicas como: emulsiones (Ej., Freund, SAF, MF59), liposomas, virosomas, iscoms, coquelatos; adyuvantes microparticulados como micropartículas PLG, poloxámeros, de tipo viral (Ej., HBcAg, HCcAg, HBsAg) y de tipo bacteriano (Ej., VSSP, OPC); y adyuvantes mucosales como enterotoxina termolábil, toxina del cólera, toxinas mutantes (Ej., LTK63 y LTR72), micropartículas y liposomas polimerizados. En el caso de la vacunación con ADN pudiera combinarse la expresión del antígeno de interés con alguna de las moléculas inmunopotenciadoras ya mencionadas en un vector de vacunación dicistrónico.

En las situaciones experimentales que se detallan en los ejemplos se demuestra que el ADN puede acoplarse no covalentemente a algunas de las partículas mencionadas y que el uso de estas mezclas disminuye la concentración óptima para

obtener respuesta antitumoral similar a la descrita para dosis superiores de ADN desnudo.

Administración a un mamífero

5 Para aplicaciones terapéuticas, las preparaciones vacunales de la presente invención son administradas a un mamífero, preferentemente un humano, en una dosis farmacéuticamente aceptable por las siguientes vías: mucosal, subcutánea, intramuscular, peritoneal, intralinfática, tópica, y por inhalación, entre otras. Puede ser administrada en el espacio intersticial de tejidos, incluyendo a: músculo, piel,
10 cerebro, pulmón, hígado, médula ósea, bazo, timo, corazón, linfonodos, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vejiga, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, ojo, glándulas y tejido conectivo. En el caso de los vectores que transfieren oligonucleótidos, su expresión es preferentemente dirigida a células somáticas diferenciadas, aunque pudiera también dirigirse a células no diferenciadas
15 o con una menor diferenciación como los fibroblastos de la piel y las células pluripotenciales presentes en la sangre.

Las dosis del inmunógeno pueden ser administradas en vehículos aceptados para el uso farmacéutico que no son tóxicos ni presentan efectos terapéuticos. Los ejemplos de estos vehículos incluyen a los intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como la albúmina, sustancias tampones, como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos saturados de origen vegetal, agua, sales, o electrolitos como el sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílica coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en la celulosa, y polietilén glicol. En la presente invención se utilizan preferentemente tampones fosfato como vehículos de las preparaciones vacunales.

En el caso del uso de proteínas y péptidos estos pueden conjugarse de forma covalente o no a moléculas conocidas como portadoras que funcionan como adyuvantes. Entre estas moléculas se encuentran la KLH, la p64K, la OPC
30 (Musacchio A et al, Vaccine 19; 3692, 2001), las VSSP. La combinación de inmunizaciones de ADN desnudo, vectores virales e inmunógenos proteicos es una alternativa que también se incluye dentro del alcance de la presente invención.

Ventajosamente, la administración de ADN plasmídico permite generar formulaciones con una o más moléculas de interés en el preparado vacunal. Así
35 mismo, las moléculas de acuerdo a la presente invención pueden ser administradas en esquemas vacunales mediante combinación de diferentes tipos de vectores (variante de inducción reestimulación, con ADN, proteínas, vectores virales).

Los vectores de ADN pueden ser administrados directamente al paciente, o las células de este pueden ser modificadas *in vivo* o *ex vivo* con estos vectores. Esta última estrategia puede ser combinada con la inserción por recombinación sitio-específica o inmunización por transgénesis somática que dirige la expresión del vector a células específicas. Además los hospederos bacterianos de los vectores de ADN pueden ser empleados como sus vehículos de transferencia *in vivo*.

De esta forma, las moléculas que portan los genes de acuerdo a la invención pueden ser usadas en forma de ADN desnudo, o en combinación con diferentes vectores químicos / bioquímicos / biológicos, naturales/sintéticos o recombinantes.

5 Pueden ser acompañadas con péptidos catiónicos, moléculas compactadoras (Ej. PEG, PEI), péptidos de localización nuclear (NLS), etc. Pueden administrarse además junto a cationes capaces de formar precipitados con el ADN, como parte de preparaciones liposomales a la que se añaden previo a la fusión de las membranas, y en vectores sintéticos de naturaleza lipídica o formados por polímeros catiónicos

10 (Ej., DOGS o DOTMA). Para la administración de los vectores de ADN pueden utilizarse además, proteínas quiméricas capaces de compactar el ADN y mediar el transporte del complejo formado y su endocitosis selectiva en las células específicas. Las moléculas de ADN portando los genes terapéuticos/vacunales de acuerdo a la invención, pueden ser empleadas para transferencia génica a células

15 empleando métodos físicos de transferencia, tales como el bombardeo de partículas, electroporación (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*), o directamente *in vivo* mediante aplicación tópica, inhalación por particulación, etcétera. Los vectores vivos comprenden partículas adenovirales o los propios hospederos donde se generan las moléculas de acuerdo a la presente invención.

20 25 Las dosis de polipéptidos y/u oligonucleótidos a emplear pueden establecerse de acuerdo a diferentes parámetros, en particular dependiendo del gen o proteína administrada como inmunógeno, del modo de administración, de la patología en cuestión, del período de tratamiento y en el caso del uso de oligonucleótidos del vector empleado para la inmunización. Un cambio en el intervalo de dosis o una ruta

30 de administración diferente de las descritas en los ejemplos que siguen, no se apartan del principio o precepto de la presente invención, siendo posible lograr una optimización de los esquemas de inmunización para obtener una mejor respuesta.

Uso terapéutico

35 Esta invención tiene ventajas respecto a los procesos de inmunoterapia pasiva que se encuentran en fases adelantadas de ensayos clínicos utilizando como blancos las mismas moléculas. En comparación con la transferencia pasiva de inmunidad a

través de la administración de anticuerpos monoclonales (Ej., anti-VEGF), la inmunización, ya sea con la proteína o con el oligonucleótido, tiene la ventaja de inducir la producción de anticuerpos endógena, además de la proliferación y expansión de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos.

5 La presente invención posee ventajas sobre las estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear el sistema del VEGF y sus receptores, debido a que estas estrategias únicamente disminuyen los niveles de VEGF circulante o bloquean el receptor KDR. La estrategia que se propone, además de lograr los efectos antes mencionados, destruye las fuentes del VEGF (es decir, la célula tumoral y el estroma asociado) y/o
10 las células que expresan sus receptores (endotelio tumoral y algunas células tumorales). Los trabajos previos realizados en esta área sólo describen una respuesta humoral como componente esencial del efecto observado. Sin la intención de limitar el alcance de la presente invención a un mecanismo particular, los ejemplos demuestran que, además de una respuesta humoral específica las
15 composiciones vacunales que se utilizan inducen una respuesta celular CD8+ que coopera con la humoral y que en el contexto tumoral es relevante la combinación de ambas para obtener un efecto antitumoral, lo anterior se evidencia en el ejemplo 9. Es posible que la respuesta celular tipo citotóxica sea mediada por el reconocimiento de alguno de los péptidos que aparecen en las tablas 1 y 2. En la misma aparecen
20 algunos segmentos peptídicos que pudieran ser relevantes en la respuesta celular dirigidas a los blancos seleccionados en la familia del VEGF, sus receptores y co-receptores. Esta información se obtuvo a través del análisis en las bases de datos del NIH y el Instituto de Heidelberg con los programas BIMAS y SYFPHEITI, respectivamente. (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind y www.bmiheldelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm). Los péptidos señalados y otras secuencias derivadas de los antígenos de interés pueden ser utilizados para la
25 inmunoterapia activa en las patologías previamente descritas, de manera individual o combinadas como parte o no de moléculas con capacidades adyuvantes. Estos péptidos pueden ser utilizados también en sus variantes oligonucleotídicas con
30 propósitos vacunales.
Los métodos para inhibir la angiogénesis y condiciones patológicas asociadas a la misma, comprenden la administración de una cantidad efectiva del ADN o proteína de alguna de las moléculas descritas en esta invención por alguna de las rutas y con el uso de alguno de los inmunopotenciadores o adyuvantes descritos anteriormente,
35 a un mamífero. Este mamífero es preferentemente un humano. Un aumento no reversible y no regulado de la angiogénesis se ha asociado a un amplio grupo de enfermedades.

El sistema que comprende a la familia del VEGF, sus receptores y co-receptores se sobre-expresa en muchas de estas condiciones patológicas como ya ha sido detallado. De esta forma, las estrategias terapéuticas que propone esta invención resultan efectivas en el tratamiento de: (a) el cáncer (tanto los tumores primarios como sus metástasis), (b) procesos inflamatorios agudos y crónicos como el asma, el distrés respiratorio, la endometriosis, la ateroesclerosis, y los edemas tisulares, (c) enfermedades de origen infeccioso como las Hepatitis y el sarcoma de Kaposi, (d) enfermedades autoinmunes como la diabetes, la soriasis, la artritis reumatoide, la tiroiditis, y (e) otras varias enfermedades y estados tales como la retinopatía diabética y del recién nacido, el rechazo al transplante de órganos, la degeneración macular, los glaucomas neovasculares, los hemangiomas y los angiofibromas.

En particular en el caso del cáncer la vacunación con los inmunógenos que propone la presente invención resulta efectiva en el tratamiento de carcinomas, sarcomas y tumores vascularizados. Algunos ejemplos de tumores que pueden ser tratados con las estrategias que se proponen incluyen: tumores epidermoides, tumores escamosos como los de cabeza y cuello, tumores colorectales, de próstata, de mama, de pulmón incluyendo los de células pequeñas y no pequeñas, de páncreas, tiroides, ovario e hígado. Estos métodos resultan también efectivos en el tratamiento de otros tipos de tumores, como: el sarcoma de Kaposi, las neoplasias del sistema nervioso central (neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanomas, carcinomas renales y gastrointestinales, rhabdomiosarcoma, glioblastomas, y leiomiosarcomas.

En específico, el uso del VEGF-A y/o su receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 como inmunógeno resulta de utilidad en el tratamiento: de tumores de diferente origen y localización y sus metástasis, de los hemangiomas, de la endometriosis, de edemas tisulares, de procesos inflamatorios crónicos como la colitis ulcerativa y enfermedad de Chron, de la ateroesclerosis, de la artritis reumatoide y la osteoartritis, de las artropatías inflamatorias, de la soriasis, del distrés respiratorio, del asma, de la tiroiditis, de la retinopatía diabética y del recién nacido, de la degeneración macular y los glaucomas, de la enfermedad autosómica VHL, de la obesidad, y del rechazo a algunos transplantes de órganos. Por su parte, una respuesta inmune contra el PIGF resulta de utilidad en casos de artritis reumatoideas y en general en el tratamiento de las artropatías inflamatorias primarias.

En el caso del VEGF-B su uso como inmunógeno resulta útil en casos de tumores de mama, ovario, riñón, melanoma, y los fibrosarcomas. El uso del VEGF-C y su receptor VEGFR-3 es de utilidad en el tratamiento de edemas tisulares, de la retinopatía diabética, de la inflamación crónica, de las úlceras y de tumores de

mama, pulmón, cabeza y cuello, esófago, estómago, linfomas, próstata, nódulos metastásicos y del sarcoma de Kaposi, los hemangioendoteliomas tipo Dabska y de la linfangiomatosis cutánea. La inmunización con VEGF-D puede utilizarse de manera específica para el tratamiento de metástasis en nódulos linfáticos

5 El uso de los correceptores NRP1 y NRP2, en la inmunización de mamíferos, resulta útil en le tratamiento en particular: de la proliferación fibrovascular en los casos de cáncer de próstata, de melanomas, de osteosarcomas, y de metástasis de cáncer de mama, así como de la retinopatía diabética y artritis reumatoide.

Los estudios basados en la inmunoterapia pasiva por administración de anticuerpos

10 han demostrado que la combinación de anticuerpos contra VEGF-A y KDR, resulta más efectiva en modelos de tumores singénicos. De esta forma, el uso de dos o más de los inmunógenos que propone la presente invención ofrece un tratamiento especialmente eficiente para la inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. Estos inmunógenos pueden administrarse de manera individual o por pares

15 utilizando vectores dicistrónicos por las vías ya mencionadas. Además las composiciones vacunales de la invención pueden usarse junto a, o en forma secuencial con drogas o agentes quimioterapéuticos que ofrezcan un beneficio para la condición bajo tratamiento.

Los resultados que se describen posteriormente demuestran que la respuesta
20 antiangiogénica y antitumoral es mediada por una cooperación de las respuestas humorales y celulares. En particular el VEGF y su receptor Flt1 intervienen en los procesos de maduración de células dendríticas y actúan sobre los precursores de linfocitos B y T. En el ejemplo 10 se demuestra que la estrategia terapéutica propuesta, además de disminuir los niveles de VEGF en suero, contribuye a la
25 normalización de las proporciones de linfocitos B y T y de células dendríticas maduras. Este efecto favorece la presentación de antígenos tumorales en el sistema MHC I, lo que mejora la calidad e intensidad de la respuesta inmune antitumoral, dirigida no solamente al inmunógeno sino al resto de los antígenos tumor asociados, tumor específicos y sobre-expresados en el contexto tumoral.

Tabla 1. Estimación de péptidos asociados al MHC tipo I en el contexto del HLA.A.0201

A.-Empleando el programa BiMAS						B.-Empleando el programa SYFPEITHI					
VEGF-A		VEGF-B		VEGF-C		VEGF-D		PIGF		PIGF	
Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd
LLSWVHWSL	272	LLAALLQL	309	YLSKTLFEI	640	FMMLYVQLV	1966	RLFPCFLQL	150		
ALLYLHHA	42	Q LAPAQAPV	70	TLF EITVPL	324	KLWRCRRL	620	V/VSEYPSEV	42		
WSL ALLYL	30	QLPSCVT	70	VLYPEYWKM	304	QLFEISVPL	324	VMRLFPCFL	42		
FLQHNKCEC	23	LMGTVAKQL	26	C MNITSY	85	YISKQLFEI	88	RALERLVDV	34		
VVHWVSLALL	20	LLAALLQLA	19	KLFPSQCAGA	64	C MNITSYI	41	VELTFSQHV	32		
FLLSWVHWS	16	LLQ LAPAQAA	8	LLGFFSVAC	32	VLQEENPLA	35	AVPPQQWAL	14		
RQELNERT	6	V VSWIDVYT	6	S LPATLPQC	11	WVVVIVFMM	27	LQLLAGLAL	14		
NITM QIMRI	3	C VPTGQHQV	6	GLQCMNTST	7	VNVFMMLYV	10	RSGDRPSYV	10		
YCHPIETLV	2	KCLV PSCVT	4	AAFE SGLDL	4	S LICMNTST	7	LLAGLALPA	8		
IEYIFKPSC	2	VV/VPLTVEL	3	EQLRSVSSV	4	CVLQEENPL	7	CVPVETANV	6		
A.-Empleando el programa BiMAS						B.-Empleando el programa SYFPEITHI					
VEGF-A	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	VEGF-C	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score
LLSWVHWSL	24	LLAALLQL	29	TLFEITVPL	27	FMMLYVQLV	25	ALERLVDV	26		
ALLYLHHA	24	Q LAPAQAPV	26	DLEEQLRSV	26	QLFEISVPL	25	RLFPCFLQL	24		
VVHWVSLALL	20	QLPSCVT	26	YLSKTLFEI	26	YISKQLFEI	24	RALERLVDV	24		
SI ALLYLH	20	VV/VPLTVEL	24	ALLGPREA	24	KLWRCRRL	23	LLAGLALPA	22		
SYCHPIETL	19	LLRRLLAA	23	C MNITSY	21	RAAS SLEEL	22	LAGLALPAV	22		
NITM QIMRI	19	LLAALLQLA	23	DICGPNKEL	21	SLEELLRT	22	VMRLFPCFL	20		
FLLSWVHWS	18	FLRCQGRGL	22	AAAFAESGL	20	ATFYDIETL	22	CFLQLLAGL	20		
WSL ALLYL	18	L TVELMGTV	21	AAFE SGLDL	20	EISVPLTSV	22	QLLAGLALP	20		
HPIETLVDI	18	LLRLLAAL	20	VLYPEYWKM	20	S LICMNTST	20	SAGNGSSEV	20		
CNDEGLECV	18	LMGTVAKQL	19	IIRSLPAT	20	VPLTSVPEL	20	VVSEYPSEV	20		

Nota: Se señalan en negritas los valores de aquellos péptidos o regiones de los mismos, que coinciden en las dos predicciones.

Tabla 2. Estimación de péptidos asociados al MHC tipo I en el contexto del HLA A.0201

A.-Empleando el programa BiMAS						B.-Empleando el programa SYFPEITHI.					
VEGFR-1		VEGFR-2		VEGFR-3		NRP-1		NRP-2		NRP-2	
Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd
FLYRDTVVI	1942	VLLWEIFSL	1792	VLLWEIFSL	1793	GLLRFVTAV	2249	WMYDHAKWL	5121		
VLLWEIFSL	1792	SLQDQGDYYV	769	RLEEKSGV	1055	VLLGAVCGV	1006	ILQFLIFDL	484		
KLLRGHTLV	901	VLLAVALWL	739	VLWPDGQEY	981	WMPENIRLV	436	YLQVDLRFV	247		
GLLTCEATV	257	AMFFWLLV	427	NLTDLLVN	656	GILSMVFYT	278	ALYFSRHQV	223		
TLFWLLLTL	182	VIAAMFFWLL	270	KQAERGKVV	557	LLCAVIALV	272	NMLGMLSGL	131		
ILLSENNNVV	179	ILLSEKNVV	179	GVIAVFFWV	369	VLLHKSLLKL	134	WLYTLDPL	129		
TNLNTIMNV	160	LLAVALWL	146	KLVIQNANV	243	GMLGMVSGL	131	DWWDGIPHV	56		
CVAATLFWL	137	KNLDLTWKL	128	ALWNSAAGL	177	FQLTGGTTV	120	KMEILQFL	44		
LLSIKQSNV	118	AVIAMFFWLV	113	TLSLSIPRV	160	VLAKEKPTV	118	VLNKLHAPL	36		
SLQDSGTYA	112	LLLVIILRT	108	SQHDLGSYV	159	GPFLFKFV	81	LLGATCAGL	36		
A.-Empleando el programa BiMAS						B.-Empleando el programa SYFPEITHI.					
VEGFR-1		VEGFR-2		VEGFR-3		NRP-1		NRP-2		NRP-2	
Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score	Secuencia	Score
TLFWLLLTL	29	VLLWEIFSL	29	VLLWEIFSL	29	VLLGAVCGV	30	NMLGMLSGL	27		
VLLWEIFSL	29	LLVILRTV	28	SIPGLNIVTL	27	GLLRFVTAV	29	ILQFLIFDL	26		
ILPGGSSTL	28	GLFCKTLTI	26	NLTDLLVN	27	LLCAVIALV	28	DWWDGIPHV	26		
LLCALLSCL	27	SIMYIVVAV	26	VLWPDGQEY	26	GMLGMVSGL	28	YLQVDLRFV	26		
GLLTCEATV	27	IIIVGTAVI	26	LLPRKSSEL	26	ALGVILGAV	28	TLDPLITI	26		
LIRGHTLV	27	ALMSELKIL	26	ALWNSAAGL	26	VLLHKSLLKL	27	ILAKPKMEI	25		
ALMTELKIL	26	AASVGLPSV	25	IMDPGEVPL	26	VLAKEKPTV	26	VLNKLHAPL	25		
KLLRGHTLV	25	SISNLNVSL	25	RLWLCLGLL	25	QLTGGTTV	25	LLGATCAGL	25		
TNLNTIMNV	25	AMFFWLLV	25	LIYFVTTI	25	VLLGAVCGV	30	ALYFSRHQV	23		
ILLSENNNVV	25	ILLSEKNVV	25	LLEGQPVLL	25	GLLRFVTAV	29	GIGMRLEV	23		

Nota: Se señalan en negritas los valores de aquellos péptidos o regiones de los mismos, que coinciden en las dos predicciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonaje y expresión transiente de los antígenos.

VEGF humano, sus isoformas y mutantes funcionales

5 Para el clonaje de las isoformas del VEGF se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) usando como molde el ADN complementario de un aislamiento previo de ARNm de la línea celular CaSk (ATCC CRL 1550), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Perkin-Elmer) y con el empleo de los cebadores SEQ ID1 y SEQ ID2. Las bandas correspondientes a los productos de la amplificación de

10 las isoformas del VEGF 121, 165 y 189 fueron extraídas de geles de agarosa al 2%. Luego de la digestión de las bandas con las endonucleasas BamH1 y EcoR1, el ADNc de las isoformas fue purificado y clonado de manera independiente en el pAECΔ2, vector propietario del CIGB. Los plasmidos resultantes fueron secuenciados y se determinó que estos no contenían mutaciones con respecto a las

15 secuencias de aa reportadas en el EMBL (www.embl-heidelberg.de) para las isoformas clonadas. Seguidamente los ADNc correspondientes a las isoformas del VEGF se sub-clonaron KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5, que, entre otras características, difiere del pAECΔ2 en la presencia de 5 sitios CpG inmunoestimuladores.

20 Se obtuvo el ADNc de una variante deficiente para la unión al receptor KDR ($\text{VEGF}_{\text{KDR}(-)}$) por mutagénesis dirigida de la isoforma VEGF₁₂₁ ya clonada, como se ha descrito por Siemeister G y col (Siemeister G et al. J Biol Chem 273:11115, 1998). La variante mutada se generó por RCP utilizando los siguientes cebadores:

25 (A) Amplificación del fragmento 5' terminal (315 bp): empleando los cebadores con la secuencia SEQ ID3 e SEQ ID4

(B) Amplificación del fragmento 3' terminal (93bp): empleando los cebadores con la secuencia SEQ ID5 e SEQ ID6

Los fragmentos así amplificados se purificaron como ya se ha referido y fueron usados en condiciones equimolares como molde para una RCP de fusión usando los

30 cebadores correspondientes a la secuencia SEQ ID7 e SEQ ID8. El ADNc resultante que contiene la mutación se digirió BamH1 / EcoR1, y fue purificado y clonado en el vector pAECΔ2. Las mutaciones introducidas se chequearon por secuenciación, y el ADNc correspondiente al $\text{VEGF}_{\text{KDR}(-)}$ se sub-clonó KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5, resultando el pMAE5Δ5 VEGF_{KDR(-)}.

35 Los plasmidos utilizados tanto en los ensayos de transfección como en la vacunación de animales se purificaron en condiciones libres de endotoxina, como ha

sido descrito por Whalen R. y col (Whalen RG y Davis HL. Clin Immunol Immunopathol 75:1, 1995). Brevemente, el ADN se purificó utilizando los sistemas QUIAGEN libres de endotoxinas de acuerdo a las instrucciones del fabricante, sometiéndose el ADN, posteriormente, a una segunda precipitación. Finalmente el 5 ADN quedó disuelto en PBS libre de endotoxinas (SIGMA, USA) a una concentración final de 4 mg/mL

1.2 Receptor del VEGF humano (KDR/Flik1)

Los ADNc que codifican para los dominios 1-3 extracelulares del receptor KDR del 10 VEGF (KDR1-3) y para el dominio transmembrana e intracelular del propio receptor (KDR TC) se obtuvieron a partir de un RT-PCR sobre ARNm de células endoteliales HUVEC (Clonetic, USA) tratadas con VEGF humano (Sigma) y Heparina (Sigma). En el caso de los dominios extracelulares del 1 al 3 se emplearon cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID9 e SEQ ID10. Luego de la digestión del 15 fragmento amplificado (943 pb) con las endonucleasas BamHI y EcoRI, el ADNc de los dominios 1-3 del KDR se purificó y clonó en el vector pAECAΔ2. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación del ADN correspondiente. Seguidamente el ADNc correspondiente al KDR1-3 se sub-clonó KpnI/EcoRV en el vector pMAE5Δ5 ya descrito (pMAE5Δ5 KDR1-3).

20 Para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor, se diseñó una estrategia de inserción de dicha zona en dos pasos. Para la inserción del primer segmento se emplearon los cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID11 e SEQ ID12. Luego de digerir esta banda de 747 pb XbaI/BglII el producto se clonó en el vector pMAE5 previamente digerido con las mismas enzimas, 25 obteniéndose el vector PMAE5 KDR 747. Este vector fue digerido BglII/NotI para insertar el fragmento carboxilo terminal de 1091pb restantes que se amplificaron con al utilización de los cebadores que corresponden con las secuencias SEQ ID13 e SEQ ID14. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación de ADN y se denominaron (pMAE5 KDR C).

30 1.2.1 Clonaje de la zona transmembranaria y citosólica del KDR humano en un vector viral.

Para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) en el virus de viruela aviar, se emplearon los cebadores correspondientes con las secuencias SEQ ID15 e SEQ ID16. Luego de digerir esta banda de 953 pb 35 StuI/SmaI el producto se clonó en el vector pFP67xgpt previamente digerido con las mismas enzimas. En este propio vector digerido SmaI/BamHI se insertaron los 919pb restantes que se ampliaron del ADNc original usando los cebadores con la

secuencia descrita en SEQ ID17 e SEQ ID18. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron por secuenciación de ADN y se denominaron (pFP67xgpt KDR C).

Los virus de viruela aviar (FWPVs) se replicaron en fibroblastos de embrión de pollo (FEP) en medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino. El pFP67xgpt KDR C se transfeció utilizando lipofectina (Gibco BRL, Grand Island, USA) en FEP previamente infectados con la cepa atenuada FP9. Después de 24 horas se añadió medio fresco y las células se cultivaron por tres o cuatro días más. Después de este tiempo las células se congelaron y descongelaron tres veces. Los virus recombinantes que expresaban el gen codificante para la enzima Ecogpt se purificaron en medio selectivo con ácido micofenólico (25 µg/mL), xantina (250 µg/mL) e hipoxantina (15 µg/mL) (MXH). La inclusión correcta del gen en los virus recombinantes se chequeó por RCP. Los virus recombinantes se denominaron FPKDRgpt y los no recombinantes utilizados como control negativo FP.

15

Ejemplo 2

Expresión “*in vivo*”de los antígenos.

Con el objetivo de confirmar la potencialidad de las construcciones realizadas para expresar las proteínas “*in vivo*”, las mismas se inyectaron en el músculo cuadriceps femoral de ratones C57BL6 (3 por grupo)

1. pMAE5Δ5- VEGF₁₂₁ (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5- VEGF₁₆₅ (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5Δ5- VEGF₁₈₉ (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
4. pMAE5Δ5- VEGF_{KDR(-)} (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 25 5. pMAE5Δ5- KDR 1-3 (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
6. pMAE5 KDR C (10 y 50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
7. FPKDRgpt (2.5×10^7 ufp) en PBS pH 7.2
8. PBS pH 7.2 (control negativo)

Después de 48 horas los animales fueron sacrificados y los músculos inyectados se extrajeron en una pieza. Una parte del tejido muscular fue homogenizado en presencia de inhibidores de proteasas y detergentes no iónicos. La presencia de VEGF en los extractos proteicos se analizó por Dot Blot y Western Blot utilizando un anticuerpo polyclonal que reconoce todas las isoformas del VEGF humano (sc-152G), siguiendo procedimientos ya descritos. Del tejido muscular restante se extrajo el ARN total utilizando TRI-Reagent (SIGMA). Un total de 20 µg de ARN por situación experimental, se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al

1% con formaldehído. El ARN fue transferido a un filtro de nylon (Hybond) e hibridado con el ADNc de la isoforma 121 del VEGF marcada con ATP³², la cual reconoce todas las isoformas del VEGF o con el ADNc del KDR igualmente marcado. En ambos casos los filtros fueron rehíbridados con un fragmento de ADNc correspondiente a un gen constitutivo: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En todas las construcciones ensayadas se identificaron las bandas correspondientes a las isoformas del VEGF humano y los fragmentos del receptor KDR clonados.

10 **Ejemplo 3**

Experimentos de protección *in vivo* empleando la vacunación con el plasmidio que contiene el gen del KDR, receptor del VEGF.

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 15 2. pMAE5-KDR C (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. FPKDRgpt (2.5×10^7 ufp)
4. PBS pH 7.2 (control negativo)
5. FP (2.5×10^7 ufp) (control negativo grupo 3)

En todos los casos, la inmunización fue por vía im en la pata trasera izquierda con 20 un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. El reto tumoral se desarrolló 30 días después de la última inmunización, con la inoculación subcutánea de 10^4 células del melanoma B16 F10 (ATCC, CRL-6475) en la zona ventral derecha de todos los animales. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres 25 mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones.

En los ratones inmunizados con el plasmidio pMAE5Δ5-KDR 1-3 se evidenció una reducción del tamaño tumoral a las dosis de 50 y 100 µg de ADN/ratón, significativamente menor respecto al control negativo (Tabla 3). Un análisis de sobrevida en el día 33 evidenció un aumento significativo (con respecto al control 30 negativo) de este parámetro para los ratones inmunizados con dicha a concentraciones de 50 y 100 µg de ADN por animal (Tabla 3) con respecto a los ratones no inmunizados (grupo PBS pH7.2). En el caso del pMAE5Δ5-KDR C (Tabla 3) se evidenció una disminución significativa del volumen tumoral en las cuatro concentraciones empleadas con aumento en la sobrevida a las dosis de 100 a 10 35 µg/ml. El empleo de vectores virales redujo volumen y aumento sobrevida en la condición ensayada para la construcción FPKDRgpt (Tabla 4) en comparación con

su respectivo control negativo (grupo de ratones inmunizados con el vector sin inserto FPgpt).

5 Tabla 3. Volumen tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados con el gen del receptor del VEGF (KDR) en la construcción de ADN desnudo pMAE5Δ5-KDR 1-3.

Grupo	[ADN µg]	Vol. Tumoral (mm ³). Día 24	Supervivencia (Día 43)
pMAE5Δ5-KDR 1-3	100	424.0 ± 199.2 (***)	(***)
	50	756.32 ± 435.9 (***)	(**)
	10	1024.2 ± 397.1 (*)	(ns)
	1	1334.2 ± 620.7 (ns)	(ns)
pMAE5Δ5-KDR C	100	404.23 ± 200.0 (***)	(***)
	50	633.2 ± 365.2 (***)	(***)
	10	924.3 ± 437.1 (**)	(*)
	1	1114.2 ± 665.7 (*)	(ns)
FPKDRgpt	2.5*10 ⁷ ufp	304.23 ± 152.0 (***)	(***)
FPgpt	2.5*10 ⁷ ufp	1891.0 ± 726.0 (ns)	(ns)
PBS pH 7.2	-	1785.0 ± 826.0	-

Nota El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p≤ 0.05 no significativa; *, p≤ 0.05; **, p≤ 0.01; y ***, p≤ 0.001.

Ejemplo 4

15 Experimentos de protección *in vivo* empleando la vacunación con los plasmidos que contiene las isoformas del VEGF y su variante mutada

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes:

1. pAECΔ2-VEGF₁₂₁ (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5Δ5-VEGF₁₆₅ (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
- 20 4. pMAE5Δ5-VEGF₁₈₉ (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
5. pMAE5Δ5 VEGF_{KDR(-)} (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS pH 7.2
6. PBS pH 7.2 (control negativo)

En todos los casos, la inmunización fue por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 μL totales. Todos los animales fueron reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. El reto tumoral se desarrolló 30 días después de la última inmunización con 5 la inoculación subcutánea de 10^4 células del melanoma B16 F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha de todos los animales. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones.

Para la variante de ADN desnudo en el vector de la serie pAEC en el grupo 10 inmunizado con 100 μg de ADN por animal, se observó un crecimiento tumoral menor que el del control negativo (Tabla 4). En las variantes incluidas en el vector de la serie pMAE5 Δ 5 con 5 sitios CpG, independientemente de la isoforma empleada, el tamaño tumoral fue significativamente menor con respecto al control negativo en los grupos de ratones inmunizados con las dosis de 10, 50 ó 100 μg de ADN. En el caso 15 que fue empleada la variante mutada pMAE5 Δ 5 VEGF_{KDR(-)} se obtuvo una reducción significativa del tumor a concentraciones similares a las empleadas con el pMAE5 Δ 5-VEGF₁₂₁.

Un análisis de sobrevida en el día 43 evidenció un aumento significativo (con respecto al control negativo) de este parámetro para los ratones inmunizados con las 20 variantes pMAE5 Δ 5-VEGF₁₂₁, pMAE5 Δ 5-VEGF₁₆₅, pMAE5 Δ 5-VEGF₁₈₉, pMAE5 Δ 5 VEGF_{KDR(-)}, a concentraciones de 50 y 100 μg de ADN por animal (Tabla 4).

25 Tabla 4. Volumen Tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados con diferentes variantes de ADN desnudo contenido el gen del VEGF en diferentes isoformas y mutado.

Grupo	[ADN μg]	Vol. Tumoral (mm^3) (Día 24)	Supervivencia (Día 43)
PAEC Δ 2-VEGF ₁₂₁	100	991.5 ± 354 (*)	ns
	50	1429.2 ± 396 (ns)	ns
	10	1506.6 ± 442 (ns)	ns
	1	1660.5 ± 456 (ns)	ns
PMAE5 Δ 5-VEGF ₁₂₁	100	645.0 ± 215 (***)	***
	50	850.1 ± 463 (***)	***
	10	992.1 ± 410 (*)	ns
	1	1560.3 ± 598 (ns)	ns

PMAE5Δ5-VEGF ₁₆₅	100	799.2 ± 335	(***)	***
	50	916.6 ± 390	(**)	**
	10	1000.5 ± 662	(*)	ns
	1	1845.3 ± 450	(ns)	ns
PMAE5Δ5-VEGF ₁₈₉	100	790.1 ± 235	(***)	***
	50	996.5 ± 255	(*)	**
	10	1050.2 ± 362	(*)	ns
	1	1670.2 ± 408	(ns)	ns
pMAE5Δ5 VEGF _{KDR(-)}	100	550.1 ± 335	(***)	***
	50	894.7 ± 408	(**)	***
	10	991.8 ± 362	(*)	ns
	1	1489.3 ± 510	(ns)	ns
PBS pH 7.2	0	1673.9 ± 712		

Nota El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en

5 el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, p≤ 0.05 no significativa; *, p≤ 0.05; **, p≤ 0.01; y ***, p≤ 0.001.

Ejemplo 5

10 Experimentos de protección *in vivo* en modelo de artritis inducida por colágeno mediante la inmunización con pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ y pMAE5Δ5-KDR 1-3

Grupos de 20 ratones fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
3. PBS pH 7.2 (Control negativo)

15 En todos los casos, la inmunización (día 0) fue por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron reinmunizados en el día 15 empleando el mismo régimen de la inmunización original. En el día 5 se inició la inducción de artritis autoinmune por inmunización con colágeno II de pollo (Sigma), modelo previamente descrito por Campbell IK y col

20 (Campbell IK et al Eur. J. Immunol. 30: 1568, 2000). Esta inmunización se repitió en el día 26. Las cuatro patas de los ratones fueron evaluadas diariamente según el índice de artritis que establece una puntuación de 0 a 3 para cada pata por la

presencia en el examen de signos de eritema (1), inflamación (2) o rigidez articular (3) con un valor máximo de 12. Los ratones comenzaron a manifestar los síntomas clínicos del desarrollo de la artritis a los 23 días de la inducción de la misma, alcanzándose el máximo de incidencia a los 50 días. En la tabla 5 aparece el análisis 5 de la incidencia de artritis en los animales de los diferentes grupos experimentales. En los días 40 y 55 se observa una reducción significativa de la incidencia de artritis en los grupos vacunados (1 y 2) en comparación con el grupo control.

Tabla 5. Incidencia de artritis en dos días seleccionados (40 y 55).

Grupo	Incidencia Día 40	Incidencia Día 55
1	20/8 (40%)	20/9 (45%)
2	20/6 (30%)	20/12 (60%)
3	20/10 (50%)	20/14 (70%)

10

Ejemplo 6

Efecto antiangiogénico de la vacunación *in vivo*

Grupos de 15 ratones fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
- 15 2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
3. pMAE5 KDR C (50 µg/ratón) en PBS pH 7.2
4. PBS pH 7.2 (Control negativo)

En todos los casos, la inmunización fue por vía intramuscular (im) en la pata trasera izquierda con un volumen de 50 µL totales. Todos los animales fueron 20 reinmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. Treinta días después de la última inmunización se evaluó la angiogénesis *in vivo* en estos animales usando matrigel como ya se ha descrito por Coughlin MC y col. (Coughlin MC et al. J. Clin. Invest. 101:1441, 1998). Los animales previamente vacunados fueron divididos en grupos de 5 e inyectados por vía subcutánea en la 25 línea media abdominal con 500µl de Matrigel (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) conteniendo:

1. VEGF 50 ng/mL, Heparin 50 U/mL
2. 10⁵ células de melanoma B16F10
3. PBS

30 A los seis días los animales fueron sacrificados y se extrajo el tapón de Matrigel, donde se analizó el contenido de hemoglobina de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Drabkin's reagent kit; Sigma Diagnostics Co., St. Louis, Missouri, USA).

La vacunación con los plasmidios que codifican para el VEGF o su receptor KDR inhibe de manera significativa ($p<0.001$) tanto la vascularización inducida por VEGF como la inducida por sistemas más complejos: células tumorales.

5 **Ejemplo 7**

Obtención de un inmunógeno basado en la unión no covalente de pMAECΔ5-VEGF₁₂₀ a diferentes agentes adyuvantes.

Se emplearon diferentes agentes inmunoestimuladores, previamente reportados, los que fueron mezclados con la construcción pMAECΔ5-VEGF₁₂₀ con la metodología

10 que se describe a continuación.

La proteína Opc de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* fue purificada acorde a lo reportado por Musacchio y cols (Musacchio A et al. Vaccine, 67:751, 1997). 50 µg/mL de pMAECΔ5-VEGF₁₂₀ se añadieron a 10 µg/mL de Opc mediante agitación suave a pH ácido. El complejo resultante se dializó durante toda la noche en PBS pH 7.2 calidad endo free (Sigma). El grado de asociación entre el ADN plasmídico y la proteína Opc (Opc- pMAECΔ5-VEGF₁₂₀) se chequeó mediante la visualización del ADN empleando un gel de agarosa al 1%. Más de un 50% del ADN plasmídico se asoció con la proteína Opc.

Las partículas super pequeñas (VSSP) provenientes del complejo de proteínas de la membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis* suministradas por el Centro de Inmunología Molecular (R. Perez et al United States Patent application 5788985, y 6149921) se emplearon para su combinación con el ADN plasmídico de interés. Las VSSP (1 mg) se incubaron con 5 mg de pMAECΔ5-VEGF₁₂₀ durante toda la noche con agitación lenta. El material resultante se dializó extensivamente en PBS pH 7.2 calidad endo free (Sigma). El grado de asociación entre el ADN plasmídico y las VSSP (VSSP- pMAECΔ5-VEGF₁₂₀) se chequeó mediante la visualización del ADN empleando un gel de agarosa al 1%. Más de un 50% del ADN plasmídico se asoció con las partículas de VSSP.

El antígeno particulado del core del virus de la Hepatitis C (HCCAg) y del virus de la Hepatitis B (HBcAg) se produjeron acorde con lo reportado previamente (Lorenzo LJ et al., Biochem Biophys Res Commun 281:962, 2001). 1 mg del antígeno se mezcló con 5 mg del plasmidio en una incubación durante toda la noche. El grado de asociación entre el ADN y el HCCAg o HBcAg (HCCAg- pMAECΔ5-VEGF₁₂₀ y HBcAg- pMAECΔ5-VEGF₁₂₀, respectivamente) se chequearon empleando el método convencional de la visualización de ADN en un gel de agarosa al 1%. Más del 50% del ADN se asoció con la partícula antigénica, en cada caso.

Ejemplo 8

Experimentos de protección *in vivo* con la construcción pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ empleando adyuvantes de la respuesta inmune.

5 Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 µg de ADN/ratón) en PBS pH 7.2
2. Opc-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 µg de ADN/ratón)
3. VSSP-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 µg de ADN/ratón)
4. HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 µg de ADN/ratón)

10 5. HCcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 µg de ADN/ratón)

6. PBS pH 7.2 (Control negativo del grupo 1)
7. Opc (Control negativo del grupo 2)
8. VSSP (Control negativo del grupo 3)
9. HBcAg (Control negativo del grupo 4)

15 10. HCcAg (Control negativo del grupo 4)

El procedimiento de inmunización, reto con el tumor y medición del volumen tumoral fueron similares a los descritos en el ejemplo anterior. Las variantes vacunales con concentraciones similares o mayores de 10 µg de ADN/ ratón disminuyeron el crecimiento tumoral en comparación con sus respectivos controles negativos (Tabla 6). Una supervivencia significativamente superior al grupo control respectivo fue observada para los animales inmunizados con el gen del VEGF solo o asociado con OpC, VSSP, HCcAg y HBcAg como vehículos inmunopotenciadores. Todas las variantes con "vehículos" mostraron una sobrevida significativamente superior al control negativo respectivo desde dosis de 10 µg de ADN / ratón, mientras que la variante "desnuda" con el vector pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ resultó significativamente diferente del control negativo con la dosis de 50 µg de ADN/ratón (Tabla 6).

Tabla 6 Volumen tumoral y sobrevida en los ratones inmunizados empleando diferentes agentes inmunoestimuladores.

Grupo	[ADN µg]	Vol. Tumoral (cm ³). (Día 24)	Supervivencia (Día 43)
pMAE5Δ5-VEGF	50	1050.9 ± 689 (**)	ns
	10	1229.0 ± 596 (*)	ns
	1	1895.3 ± 596 (ns)	ns
OpC-pMAE5Δ5-VEGF	50	960.6 ± 456 (**)	**

	10	1100.5 ± 615	(**)	*
	1	1654.8 ± 663	(ns)	ns
VSSP-pMAE5Δ5-VEGF	50	884.6 ± 410	(***)	**
	10	1002.3 ± 598	(**)	*
	1	1532.7 ± 745	(ns)	ns
HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950.1 ± 570	(**)	**
	10	1230.5 ± 662	(*)	*
	1	1867.2 ± 652	(ns)	ns
HCcAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950.1 ± 570	(**)	**
	10	1230.5 ± 662	(*)	*
	1	1867.2 ± 652	(ns)	ns
OpC (5μg/ratón/dosis)	5 μg	2059.0 ± 687	(ns)	ns
VSSP		2156.0 ± 759	(ns)	ns
HBcAg (5μg/ratón/dosis)		1998.2 ± 798	(ns)	ns
HCcAg (5μg/ratón/dosis)		1897.0 ± 812	(ns)	ns
PBS pH 7.2		2073.0 ± 816	(ns)	ns

Nota: El volumen tumoral se reporta como la media \pm SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, $p \leq 0.05$ no significativa; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; y ***, $p \leq 0.001$.

Ejemplo 9

Experimentos de protección *in vivo* empleando la vacunación con el VEGF en su forma proteica.

Grupos de 10 ratones C57BL/6 fueron vacunados o no, con las siguientes variantes: VEGF165 (20 μg /ratón) con Adyuvante completo e incompleto de Freund Adyuvante completo e incompleto de Freund (control negativo del grupo 2) El antígeno de VEGF₁₆₅ se obtuvo de una fuente comercial (Sigma) con más de un 97% de pureza. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal empleando el adyuvante completo de Freund (Sigma) con re-inmunizaciones en el día 15 y 30 por la misma vía, pero empleando el adyuvante incompleto de Freund. El reto tumoral y medición del volumen tumoral fueron similares a los descritos en el ejemplo anterior.

Se observó una disminución significativa del volumen tumoral y aumento de la sobrevida al reto tumoral, con respecto al grupo control no inmunizado, similar a la descrita en los ejemplos anteriores para las inmunizaciones con ADN VEGF.

5 **Ejemplo 10**

Experimentos *in vivo* de transferencia de la protección inmune en ratones C57BL/6 con una inmunodeficiencia severa combinada (SCID).

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados o no con dosis de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ a 50 µg

de ADN/ratón mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 5. Los ratones se

10 sacrificaron al día 45 de la inmunización inicial, y los linfocitos CD8, CD4 y tipo B de los ratones inmunizados o no, se separaron empleando perlas magnéticas (Dynabeads, USA), acorde a lo recomendando por los fabricantes.

Grupos de 10 ratones C57BL/6 SCID con 6 semanas de edad fueron "reconstituidos" con las siguientes combinaciones de los linfocitos extraídos anteriormente.

15 Grupo 1: Linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ provenientes de ratones inmunizados con el pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁. No se reconstituyen linfocitos B.

Grupo 2: Linfocitos B y T CD4+ de ratones inmunizados, y linfocitos T CD8+ de ratones no inmunizados

20 Grupo 3: Linfocitos B, linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ de ratones inmunizados, como control positivo del experimento

Grupo 4: Linfocitos B y linfocitos T CD8+, y linfocitos T CD4+ de ratones no inmunizados, como control negativo del experimento

25 Los ratones SCID "reconstituidos" fueron retados con 10⁴ células del melanoma B16 F10 por vía subcutánea. Se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral con tres mediciones semanales hasta que comenzaron a morir los ratones. El nivel de anticuerpos anti-VEGF se monitoreó mediante un ELISA de laboratorio. Placas de 96 pocillos se recubrieron con VEGF165 (Sigma) a 0.5 µg/mL. Las placas se bloquearon con PBS-BSA 1% (BDH, UK), y posteriormente se incubaron con diluciones seriadas del suero de los ratones. Luego de lavar los pocillos con PBS-30 Tween 0,05% se procedió a incubar los mismos con un polyclonal comercial anti IgG de ratón (Sigma, A0168). La señal se amplificó en presencia del sustrato comercial orto-fenilen-diamina (OPD, Sigma).

En la tabla 7 se reflejan los resultados de sobrevida (día 24) y volumen tumoral (día 40) de los grupos de ratones sometidos al reto tumoral. A partir del día 15 post-reconstitución los animales del grupo 1 al 3 presentaron una reducción del tamaño tumoral con respecto al grupo 4, reconstituido con linfocitos de ratones no

inmunizados. Por lo tanto, el efecto que desencadena el sistema inmunológico en los ratones inmunizados, que posibilita la disminución del tamaño tumoral está relacionado con una respuesta humoral (linfocitos B) y celular (linfocitos T), está última de tipo citotóxica (CTL) producto de la ausencia de anticuerpos anti-VEGF en el suero de los ratones del grupo 1. Sin embargo, en las condiciones experimentales empleadas la sobrevida sólo fue superior en el grupo 3 (linfocitos B y T de ratones inmunizados) con respecto al resto de los grupos ensayados (Tabla 7). En los animales reconstituidos parcialmente donde se encontraba ausente la respuesta B o T de tipo CTL, grupos 1 y 2, respectivamente, la sobrevida no difirió del control negativo, lo que demuestra que la respuesta humoral y celular (combinada), grupo 4, posee un efecto sinérgico que posibilita la respuesta efectiva capaz de alargar la vida de los ratones sometidos al reto tumoral.

15 Tabla 7. Efecto del volumen tumoral y sobrevida en los ratones SCID reconstituidos con linfocitos de ratones inmunizados con pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁.

Grupo	Ratones donantes de linfocitos a los C57BL/6 SCID			Vol Tumoral (Día 24)	Supervivencia (Día 40)
	Linf. B	Linf. CD4+	Linf. CD8+		
1	-	Inmunizados	Inmunizados	1067.8 ± 689 (ns)	ns
2	Inmunizados	Inmunizados	No inmunizados	1129.0 ± 596 (ns)	ns
3	Inmunizados	Inmunizados	Inmunizados	652.3 ± 396 (***)	***
4	No inmunizados	No inmunizados	No inmunizados	1856.0 ± 756	-

Nota: Los ratones donantes fueron inmunizados o no con el pMAE5Δ5-VEGF a 50 µg de ADN /ratón; Nota: El volumen tumoral se reporta como la media ± SD de las mediciones realizadas a los animales de cada grupo, las comparaciones se realizaron utilizando un ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni. En el caso de la sobrevida se reporta la significación estadística encontrada al comparar por el método de Log-Rank cada grupo respecto al grupo control en el día indicado. La significación estadística se señala como: ns, $p \leq 0.05$ no significativa; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; y ***, $p \leq 0.001$.

Ejemplo 11

25 Demostración de la restauración inmunológica por depleción del VEGF circulante a través de la respuesta inmune

Grupos de 15 ratones C57BL/6 hembra fueron inyectados por vía im., con las siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (50 µg/ratón) en PBS pH 7.2

2. PBS pH 7.2

5 En todos los casos, la inmunización fue por vía im. en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 µL. Todos los animales fueron re-inmunizados a los 15 días empleando el mismo régimen de la inmunización original. Treinta días después de la última inmunización, 5 animales por grupo seleccionados de forma aleatoria, se sacrificaron para analizar el estado inmunológico de los animales inmunizados y sus
10 controles, así como la toxicidad de la vacunación sobre órganos y tejidos, mediante evaluaciones macroscópicas e histológicas.

A los animales restantes de cada grupo se les inyectó por vía sc. 10⁴ células del melanoma B16 F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha. A los 15 y 30 días después de la inyección de las células tumorales, se sacrificaron 5 ratones por
15 grupo que fueron evaluados de manera similar a la descrita previamente.

En ningún animal evaluado se evidenció la ocurrencia de eventos tóxicos a un nivel macroscópico y el análisis histopatológico no reveló la presencia de daños en ninguno de los órganos analizados a los 30 días de la última inmunización. La evaluación inmunológica consistió en: (1) contenido en suero de VEGF murino; (2)
20 contenido celular de linfocitos B y T, así como, el grado de maduración de células dendríticas en el bazo y en los nódulos linfáticos braquiales, axilares e inguinales. El análisis de los niveles de VEGF (R&D kit para VEGF murino) en el suero de los animales no tratados indica que, al aumentar el tiempo de exposición al tumor los niveles de VEGF se incrementan en el suero en concordancia además con el
25 incremento de la talla tumoral a lo largo del tiempo. En el grupo inmunizado contra VEGF humano se observa una reducción significativa ($p<0.001$ ANOVA, post-test Bonferroni) en los niveles de VEGF que se prolonga aún a los 30 días después del reto tumoral.

El estado del sistema inmunológico de los animales sacrificados en cada momento
30 fue analizado a través del estudio de las proporciones de las poblaciones celulares presentes en los nódulos linfáticos y el bazo según lo reportado por Gabrilovich y colaboradores (Gabrilovich D et al. Blood 92:4150, 1998). Para estos estudios se emplearon anticuerpos monoclonales comerciales contra CD3, CD19, CD11c y CD86 (B7-2) (Pharmingen) marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y
35 ficoeritrina (PE) que permitieron la visualización de las poblaciones celulares usando un citómetro de flujo (FACS). Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados del análisis por FACS de las poblaciones celulares de interés según sus marcadores de superficie.

Grupo (día)	Células totales				Fracción enriquecida con células dendríticas	
	Nódulos Linfáticos		Bazo		Nódulos Linfáticos	Bazo
A. No inmunizada	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD-11c/B7-2
No inmunizados (30 días)	8%	86%	38.1%	40.8%	60%	62.4%
Post reto tumoral (60 días)	20.1%	60.5%	3.8	11.4%	32.8%	10.2%
B. Inmunizados	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD-11c/B7-2
Inmunizados (30 días)	7.2%	87.3%	40%	39%	58.6%	60.3%
Post reto tumoral (60 días)	10.9%	80.1%	25.4	34%	53.5%	52.9%

Nota: En todos los casos los valores indican los % de células positivas del total cuantificada

5 Los análisis de las poblaciones celulares linfoides y de la maduración de células dendríticas en los animales 30 días después de la última inmunización, indican que la vacunación con ADN VEGF no induce ningún cambio en el "estado inmune" del animal. Sin embargo, 30 días después de haber implantado los tumores, los animales muestran una disminución en la relación linfocitos T/linfocitos B (CD3/CD19) tanto en nódulos linfáticos como en bazo, respecto a la relación observada antes del reto tumoral. Además, en particular en el bazo se reduce ostensiblemente el número de células linfoides. También se observó que en estos animales se produce una reducción del número de células dendríticas maduras tanto en nódulos linfáticos como en bazo. En el grupo de ratones vacunados con ADN 10 VEGF se evidencia una recuperación significativa en todos los órdenes que pudiera correlacionarse con la disminución de los niveles de VEGF en suero observados en 15 los animales de este grupo.

20

Lic. María Vázquez Castillo
Agente Oficial, CICB



LISTADO DE SECUENCIAS

Seq ID 1. Cebador para la amplificación mediante RCP de la cadena codificante del VEGF humano.

5

5'-TGGATCCATGAACCTTCTGCT

Seq ID 2. Cebador para la amplificación mediante RCP de la cadena codificante del VEGF humano.

10

5'-GAATTCACCGCCTCGGCTTGTC

Seq ID 3. Cebador para la amplificación mediante RCP de la variante mutada del VEGF humano (VEGF_{KDR(-)}) (A) Amplificación del fragmento 5' terminal (315 bp):

15

5'-TGGATCCATGAACCTTCTGCT-3'

Seq ID 4. Cebador para la amplificación mediante RCP de la variante mutada del VEGF humano (VEGF_{KDR(-)}) (A) Amplificación del fragmento 5' terminal (315 bp):

20

5'-CTGGCCTTGTGCAGGTGCGATTGCCATAAT -3'

Seq ID 5. Cebador para la amplificación mediante RCP de la variante mutada del VEGF humano (VEGF_{KDR(-)}) (B) Amplificación del fragmento 3' terminal (93bp):

25

5'-ATTATGGCAATCGCACCTGCACAAGGCC AG- 3'

Seq ID 6. Cebador para la amplificación mediante RCP de la variante mutada del VEGF humano (VEGF_{KDR(-)}) (B) Amplificación del fragmento 3' terminal (93bp):

30

5'-GAATTCACCGCCTCGGCTTGTC-3'

Seq ID 7. Cebador correspondiente a la secuencia del fragmento así amplificados empleado como molde para una RCP de fusión

35

5'-TGGATCCATGAACCTTCTGCT- 3'

Seq ID 8. Cebador correspondiente a la secuencia del fragmento así amplificados empleado como molde para una RCP de fusión

5'-GAATTCACCGCCTCGGCTTGTC-3'

5

Seq ID 9. Cebadores para la amplificación mediante RCP de los dominios extracelulares 1 al 3 del KDR.

5-TGGATCCATGGAGAGCAAGGTGCTG-3'

10

Seq ID 10. Cebadores para la amplificación mediante RCP de los dominios extracelulares 1 al 3 del KDR.

5'-GAATTCACATCAGCCCCACTGGATGC-3'

15

Seq ID 11. Cebador para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor KDR, Para la inserción del primer segmento:

5'-CCTCTAGATGTGCAAAAGTGG-3'

20

Seq ID 12. Cebador para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor KDR, Para la inserción del primer segmento:

5'-TGAGATCTTCG GGAGCTTCC-3'

25

Seq ID 13. Cebador para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor KDR, Para la inserción del fragmento carboxilo terminal de 1091pb:

5'-GAAGATC TGTATAAGGACTTC-3'

30

Seq ID 14. Cebador para el clonaje de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor KDR, Para la inserción del fragmento carboxilo terminal de 1091pb:

5'-TAGCGGCCGCTAACACAGG-3'

35

Seq ID 15. Cebador para el clonaje en el vector pFP67xgpt del virus de la viruela aviar de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) A. Banda de 953 bp del KDR StuI/Smal

5 5'-AGGCCTCTACACCTGC CAGGCA-3'

Seq ID 16. Cebador para el clonaje en el vector pFP67xgpt del virus de la viruela aviar de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) A. Banda de 953 bp del KDR StuI/Smal

10 5'-CCTAGGTTAACACAGGAGGAG-3'

Seq ID 17. Cebador para el clonaje en el vector pFP67xgpt del virus de la viruela aviar de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) B.

15 Banda de 919 bp a insertar en el vector pFP67xgpt+ banda 953 bp KDR

5'-CCCGGGATATTATAAAGATC-3'

Seq ID 18. Cebador para el clonaje en el vector pFP67xgpt del virus de la viruela aviar de las zonas transmembranaria y citosólica del receptor del VEGF (KDR) B. Banda de 919 bp a insertar en el vector pFP67xgpt+ banda 953 bp KDR

5'-TAGCGGCCGCTAACACAGG-3'

25

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB

REIVINDICACIONES

INMUNOTERAPIA ACTIVA ANTIANGIOGÉNICA.

- 5 1. Método para la vacunación activa caracterizado por la administración adyuvada o no de una composición vacunal compuesta por polipéptidos y/u oligonucleótidos codificantes para proteínas asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis, y sus variantes
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque las proteínas asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis pertenecen a la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es una de las isoformas del VEGFA
- 20 4. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína es el VEGFA 121
- 25 5. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína es el VEGFA 165
- 30 6. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la proteína es el VEGFA 189
- 35 7. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es una de las isoformas del VEGFB
8. Método según las reivindicaciones 1, 2 y 7, caracterizado porque la proteína es el VEGFB 167
9. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es el VEGFC
10. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es el VEGFD
11. Método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la proteína es el PIGF
12. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque las proteínas asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis pertenecen al grupo de receptores y co-receptores del VEGF
13. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el VEGFR1
14. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el VEGFR2

15. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el VEGFR3
16. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el NRP1
- 5 17. Método según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado porque la proteína es el NRP2
18. Método según las reivindicaciones 1 a la 17, caracterizado por contener como inmunógenos mutantes derivados de la familia del VEGF humano o sus receptores
- 10 19. Método según las reivindicaciones 1 a la 18, caracterizado porque los antígenos administrados son de naturaleza autóloga
20. Método según las reivindicaciones 1 a la 18, caracterizado porque los antígenos administrados son de naturaleza heteróloga
- 15 21. Método según las reivindicaciones 1 a la 20, caracterizado porque los inmunógenos son sintéticos, recombinantes, químéricos o naturales.
22. Método según las reivindicaciones 1 a la 21, caracterizado porque los inmunógenos son de naturaleza peptídica.
23. Método según la reivindicación 1 caracterizado por comprender como inmunógenos la mezcla de al menos dos de las moléculas contenidas en las reivindicaciones de la 2 a la 22
- 20 24. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de tumores en mamíferos
- 25 25. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento y prevención de tumores en humanos.
26. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos neoplásicos malignos y sus metástasis en humanos.
27. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos neoplásicos benignos.
- 30 28. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos inflamatorios agudos y crónicos.
29. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en procesos autoinmunes.

30. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 23 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, como en alteraciones oculares.

31. Método según las reivindicaciones de la 1 a la 24 para el tratamiento de entidades que cursan con incremento de la angiogénesis, en específico, de animales afectivos y ganado.

32. Una composición vacunal caracterizada por contener polipéptidos y/u oligonucleótidos codificantes y sus variantes, para proteínas asociadas directamente a un incremento de la angiogénesis, administradas en presencia o no de adyuvante farmacéuticamente aceptable

33. Una composición vacunal según la reivindicación 32, caracterizada porque la proteína asociada es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

34. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es una de las isoformas del VEGFA

35. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 121

36. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 165

37. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 34, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFA 189

38. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es una de las isoformas del VEGFB

39. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32, 33 y 38, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFB 167

40. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFC

41. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFD

42. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 33, caracterizada porque la proteína asociada es el PIGF

43. Una composición vacunal según la reivindicación 32, caracterizada porque la proteína asociada pertenece al grupo de receptores y co-receptores del VEGF

44. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR1

45. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR2

46. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el VEGFR3

47. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el NRP1

5 48. Una composición vacunal según las reivindicaciones 32 y 43, caracterizada porque la proteína asociada es el NRP2

49. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 48, caracterizada por contener como inmunógenos, mutantes derivados de la familia del VEGF humano, sus receptores o coreceptores

10 50. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 49, caracterizada porque los antígenos son de naturaleza autóloga

51. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 49, caracterizada porque los antígenos son de naturaleza heteróloga

52. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 51,

15 53. caracterizada porque los inmunógenos son sintéticos, recombinantes, químéricos o naturales.

54. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 51, caracterizada porque los inmunógenos son de naturaleza peptídica.

20 55. Una composición vacunal según la reivindicación 32 caracterizado por comprender como inmunógenos la mezcla de al menos dos de las moléculas contenidas en las reivindicaciones de la 33 a la 53

56. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 54 donde el inmunógeno es administrado como parte de vectores plásmidicos

25 57. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 54 donde el inmunógeno es administrado como parte de vectores virales

58. Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 32 a la 57 donde el inmunógeno es administrado asociado covalentemente o no a un adyuvante

30 59. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es particulado

60. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la partícula recombinante del antígeno del core del virus de las Hepatitis B

35

61. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la partícula recombinante del antígeno del core del virus de las Hepatitis C.

62. Una composición vacunal según la reivindicación 59 donde el adyuvante es específicamente la VSSP

5 63. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es de naturaleza proteica.

64. Una composición vacunal según la reivindicación 63 donde el adyuvante es la proteína Opc

10 65. Una composición vacunal según la reivindicación 63 donde el adyuvante es la proteína KLH

66. Una composición vacunal según la reivindicación 58 donde el adyuvante es una emulsión

15 67. Una composición vacunal según la reivindicación 66 donde el adyuvante es el adyuvante de Freund o sus derivados

68. Una composición vacunal según la reivindicación 66 donde el adyuvante es el Montanide ISA 51

20

